

**PATENT APPLICATION**  
**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re application of

Docket No: Q76798

YAMASHITA, Kazuaki, et al.

Appln. No.: Not Yet Assigned

Group Art Unit: Not Yet Assigned

Confirmation No.: Not Yet Assigned

Examiner: Not Yet Assigned

Filed: August 5, 2003

For: REAGENT FOR ASSAYING LIPID

**SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Submitted herewith is a certified copy of the priority document on which a claim to priority was made under 35 U.S.C. § 119. The Examiner is respectfully requested to acknowledge receipt of said priority document.

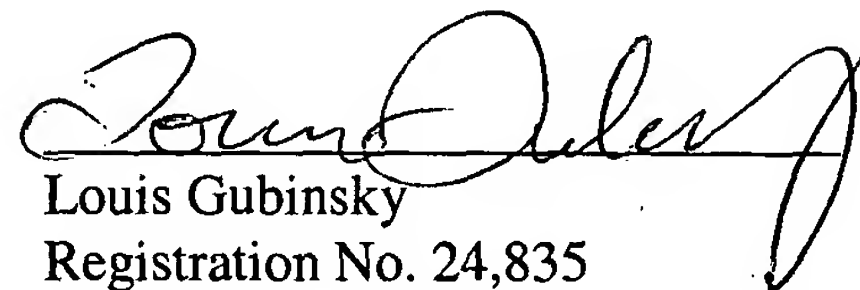
Respectfully submitted,

SUGHRUE MION, PLLC  
Telephone: (202) 293-7060  
Facsimile: (202) 293-7860

WASHINGTON OFFICE

**23373**

CUSTOMER NUMBER

  
Louis Gubinsky  
Registration No. 24,835

Enclosures: Japan 2002-232695

Date: August 5, 2003



日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 2 年    8 月    9 日  
Date of Application:

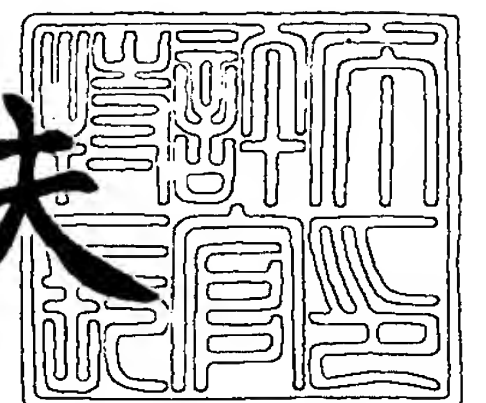
出 願 番 号                      特 願 2 0 0 2 - 2 3 2 6 9 5  
Application Number:  
[ST. 10/C] :                      [ J P 2 0 0 2 - 2 3 2 6 9 5 ]

出      願      人                      シスメックス株式会社  
Applicant(s):

2 0 0 3 年    7 月 1 8 日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 NP02-1043

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 9/16

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号  
                        シスメックス株式会社内

    【氏名】 山下 和昭

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号  
                        シスメックス株式会社内

    【氏名】 白波瀬 泰史

【特許出願人】

    【識別番号】 390014960

    【氏名又は名称】 シスメックス株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100088904

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 庄司 隆

    【電話番号】 03-3864-6572

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 067070

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 要約書 1

    【包括委任状番号】 0200385

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 リパーゼの安定化方法および安定化されたりパーゼ含有組成物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 少なくとも酵素と酸化物質を生成し得る物質とを含有する組成物における酵素の安定化方法であって、当該物質の酸化により生成された酸化物質の作用および／またはその生成を抑制することを特徴とする安定化方法。

【請求項 2】 少なくともリパーゼと酸化物質を生成し得る物質とを含有する組成物におけるリパーゼの安定化方法であって、当該物質の酸化により生成された酸化物質の作用および／またはその生成を抑制することを特徴とする安定化方法。

【請求項 3】 前記酸化物質の作用および／またはその生成を抑制することが、当該酸化物質の作用および／またはその生成を抑制する活性を有する化合物をその有効量含有せしめることにより行われることを特徴とする請求項 1 または 2 記載の安定化方法。

【請求項 4】 少なくとも酵素と界面活性剤とを含有する組成物における酵素の安定化方法であって、当該界面活性剤の酸化により生成された酸化物質の作用および／またはその生成を抑制することを特徴とする安定化方法。

【請求項 5】 少なくともリパーゼと界面活性剤とを含有する組成物におけるリパーゼの安定化方法であって、当該界面活性剤の酸化により生成された酸化物質の作用および／またはその生成を抑制することを特徴とする安定化方法。

【請求項 6】 前記界面活性剤がトリトン X-100、ニッコール OP-10、ニッコール BT-9、またはノニオン HS-210 である請求項 4 または 5 記載の安定化方法。

【請求項 7】 界面活性剤の酸化により生成された酸化物質の作用および／またはその生成を抑制することが、当該酸化物質の作用および／またはその生成を抑制する活性を有する化合物をその有効量含有せしめることにより行われることを特徴とする請求項 4 から 6 のいずれか 1 項記載の安定化方法。

【請求項 8】 前記化合物が、BHT、 $\alpha$ -トコフェロール、 $\beta$ -チオジグリコール、およびメチオニンからなる群から選ばれる少なくとも 1 である請求項

3 または 7 記載の安定化方法。

【請求項 9】 少なくとも酵素と界面活性剤とを含有する組成物における酵素の安定化方法であって、当該界面活性剤として、酸化を受ける条件下で酸化物質を実質的に生じない界面活性剤を選択して用いることを特徴とする安定化方法。

【請求項 10】 少なくともリパーゼと界面活性剤とを含有する組成物におけるリパーゼの安定化方法であって、当該界面活性剤として、酸化を受ける条件下で酸化物質を実質的に生じない界面活性剤を選択して用いることを特徴とする安定化方法。

【請求項 11】 前記界面活性剤が高純度のトリトン X-100 またはノニオン NS-210 である請求項 9 または 10 記載の安定化方法。

【請求項 12】 リパーゼがリポプロテインリパーゼである請求項 2、5、6、7、8、10、または 11 記載の安定化方法。

【請求項 13】 少なくとも酵素と酸化物質を生成し得る物質とを含有する組成物であって、当該物質の酸化により生成された酸化物質の作用および／またはその生成を抑制する手段を導入することにより安定化された酵素を含有することを特徴とする組成物。

【請求項 14】 前記酵素がリパーゼである請求項 13 記載の組成物。

【請求項 15】 前記酸化物質を生成し得る物質が界面活性剤である前記 13 または 14 記載の組成物。

【請求項 16】 前記界面活性剤がトリトン X-100、ニッコール OP-10、ニッコール BT-9、またはノニオン HS-210 である請求項 15 記載の組成物。

【請求項 17】 前記酸化物質の作用および／またはその生成を抑制する手段を導入することが、酸化物質の作用および／またはその生成を抑制する活性を有する化合物をその有効量含有せしめることである、請求項 13 から 16 のいずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 18】 前記化合物が、BHT、 $\alpha$ -トコフェロール、 $\beta$ -チオジグリコール、およびメチオニンからなる群から選ばれる少なくとも 1 である請求

項 1 7 記載の組成物。

【請求項 1 9】 少なくとも酵素と界面活性剤とを含有する組成物であって、当該界面活性剤が酸化を受ける条件下で酸化物質を実質的に生じない界面活性剤であることを特徴とする、安定化された酵素を含有する組成物。

【請求項 2 0】 前記酵素がリパーゼである請求項 1 9 記載の組成物。

【請求項 2 1】 前記酸化を受ける条件下で酸化物質を実質的に生じない界面活性剤が高純度のトリトン X-1 0 0 またはノニオン NS-2 1 0 である請求項 1 9 または 2 0 記載の組成物。

【請求項 2 2】 リパーゼがリポプロテインリパーゼである請求項 1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、2 0、または 2 1 記載の組成物。

【請求項 2 3】 請求項 1 3 から 2 2 のいずれか 1 項記載の組成物を含む試薬キット。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0 0 0 1】

##### 【発明の属する技術分野】

本発明は、酵素の安定化方法、好ましくはリパーゼの安定化方法、および安定化された酵素を含有する組成物、好ましくは安定化されたリパーゼを含有する組成物に関する。さらに詳しくは、臨床化学の分野において用いられる試薬に含まれる酵素の安定化方法、好ましくはリパーゼの安定化方法、および安定化された酵素を含有する試薬、好ましくはリパーゼを含有する試薬に関する。

##### 【0 0 0 2】

##### 【従来の技術】

リパーゼはグリセロールエステルヒドロラーゼとも呼ばれ、グリセロールエステルを加水分解し、脂肪酸を遊離する酵素群である。通常、リパーゼというときはトリアシルグリセロールリパーゼを指す。リパーゼには、腓リパーゼ、リポプロテインリパーゼ (L P L)、肝性トリアシルグリセロールリパーゼ (H T G L)、ホスホリパーゼ、糖脂質分解リパーゼ、スフィンゴ脂質分解リパーゼ、およびホルモン感受性リパーゼなど、その基質特異性や局在の異なるものが数多く知られている。

## 【 0 0 0 3 】

生体試料中の特定成分を分析する臨床検査分野においては、リパーゼは、検体中の脂質成分、例えば中性脂質、リン脂質、糖脂質、およびスフィンゴ脂質など、並びにリポ蛋白質の定量に広く用いられている。また、検体中のリパーゼを定量するときの標準物質として用いられている。

## 【 0 0 0 4 】

臨床検査分野において用いる試薬は、測定値の正確性および精密性が求められる。正確な分析を妨げる要因の1つとして、生体試料の濁りが問題となっている。試料中の濁りの主な原因は、リポ蛋白質の一種類であるカイロミクロンや超低比重リポ蛋白質であることが多い。これらのリポ蛋白質は非極性の脂質である中性脂肪の含有率が高いため、水溶液中で濁りやすいという性質を有している。その影響を回避することを目的として、これらのリポ蛋白質を可溶化するためにリパーゼを試薬に添加する方法が開示されている（特開平09-28811号公報）。試料の濁りの影響を回避する方法としては、この他に種々の界面活性剤により、濁りの原因となっているリポ蛋白質を可溶化する技術が開示されている（特開昭59-162454号公報、特開平04-7832号公報、特開2001-188065号公報）。リパーゼを反応成分に使用するリポ蛋白質や脂質成分の測定等には、リパーゼを添加する方法は適用できないため、界面活性剤を添加する方法が用いられる。

## 【 0 0 0 5 】

一方、正確な分析を妨げる別の要因として、試薬の安定性が問題となっている。臨床検査に用いられる多くの試薬は、液状あるいは凍結乾燥した状態で供給されている。凍結乾燥試薬は使用するとき、一定の溶解液で溶解される。測定後の残余試薬は冷所に保存され、次の測定に使用される。したがって、供給されるまでの期間、また保存期間中の試薬の安定性および液状製品の安定性、並びに液状製品の使用時の安定性は十分確保されていなくてはならない。しかし、一般的にリパーゼなどの酵素は不安定であることが知られている。現状では、液状製品および乾燥製剤の溶解後の使用期限の短縮や安定化物質の添加などによりこの問題に対応している。例えば、リパーゼを試薬として用いるとき、その安定化効果を



期待して界面活性剤を用いることがある。また、リパーゼは脂質と反応する場として界面（水と油とが混在する場所）が必要と考えられているため、このような場を創出してリパーゼの酵素活性を増強するめに、リパーゼを含む試薬中に界面活性剤を添加することが多い。

#### 【0006】

##### 【発明が解決しようとする課題】

かかる現状において、リパーゼと界面活性剤とを含む試薬中においてリパーゼ活性が著しく低下する現象が認められた。本発明の目的は、リパーゼと界面活性剤とを含む試薬におけるリパーゼの安定化方法および安定化された測定再現性の良好なリパーゼ含有組成物を提供することにある。

#### 【0007】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、リパーゼと界面活性剤を含む試薬においてリパーゼ活性が著しく低下する原因が、界面活性剤の酸化により生成された酸化物質にあることを見出した。これに基づき、界面活性剤の酸化により生成された酸化物質の作用および／またはその生成を抑制すること、あるいは酸化され難い界面活性剤を選択して用いること、により界面活性剤を含む組成物中のリパーゼの安定性低下を防止できることを見出して本発明を達成した。

#### 【0008】

すなわち本発明は、

- (1) 少なくとも酵素と酸化物質を生成し得る物質とを含有する組成物における酵素の安定化方法であって、当該物質の酸化により生成された酸化物質の作用および／またはその生成を抑制することを特徴とする安定化方法、
- (2) 少なくともリパーゼと酸化物質を生成し得る物質とを含有する組成物におけるリパーゼの安定化方法であって、当該物質の酸化により生成された酸化物質の作用および／またはその生成を抑制することを特徴とする安定化方法、
- (3) 前記酸化物質の作用および／またはその生成を抑制することが、当該酸化物質の作用および／またはその生成を抑制する活性を有する化合物をその有効量含有せしめることにより行われることを特徴とする前記(1)または(2)の安



定化方法、

(4) 少なくとも酵素と界面活性剤とを含有する組成物における酵素の安定化方法であって、当該界面活性剤の酸化により生成された酸化物質の作用および／またはその生成を抑制することを特徴とする安定化方法、

(5) 少なくともリパーゼと界面活性剤とを含有する組成物におけるリパーゼの安定化方法であって、当該界面活性剤の酸化により生成された酸化物質の作用および／またはその生成を抑制することを特徴とする安定化方法、

(6) 前記界面活性剤がトリトン X-100、ニッコール OP-10、ニッコール BT-9、またはノニオン HS-210 である前記 (4) または (5) の安定化方法、

(7) 界面活性剤の酸化により生成された酸化物質の作用および／またはその生成を抑制することが、当該酸化物質の作用および／またはその生成を抑制する活性を有する化合物をその有効量含有せしめることにより行われることを特徴とする前記 (4) から (6) のいずれかの安定化方法、

(8) 前記化合物が、BHT、 $\alpha$ -トコフェロール、 $\beta$ -チオジグリコール、およびメチオニンからなる群から選ばれる少なくとも 1 である前記 (3) または (7) の安定化方法、

(9) 少なくとも酵素と界面活性剤とを含有する組成物における酵素の安定化方法であって、当該界面活性剤として、酸化を受ける条件下で酸化物質を実質的に生じない界面活性剤を選択して用いることを特徴とする安定化方法、

(10) 少なくともリパーゼと界面活性剤とを含有する組成物におけるリパーゼの安定化方法であって、当該界面活性剤として、酸化を受ける条件下で酸化物質を実質的に生じない界面活性剤を選択して用いることを特徴とする安定化方法、

(11) 前記界面活性剤が高純度のトリトン X-100 またはノニオン NS-210 である前記 (9) または (10) の安定化方法、

(12) リパーゼがリポプロテインリパーゼである前記 (2)、(5)、(6)、(7)、(8)、(10)、または (11) の安定化方法、

(13) 少なくとも酵素と酸化物質を生成し得る物質とを含有する組成物であって、当該物質の酸化により生成された酸化物質の作用および／またはその生成を

抑制する手段を導入することにより安定化された酵素を含有することを特徴とする組成物、

(14) 前記酵素がリパーゼである前記(13)の組成物、

(15) 前記酸化物質を生成し得る物質が界面活性剤である前記13または14記載の組成物、

(16) 前記界面活性剤がトリトンX-100、ニッコールOP-10、ニッコールBT-9、またはノニオンHS-210である前記(15)の組成物、

(17) 前記酸化物質の作用および／またはその生成を抑制する手段を導入することが、酸化物質の作用および／またはその生成を抑制する活性を有する化合物をその有効量含有せしめることである、前記(13)から(16)のいずれかの組成物、

(18) 前記化合物が、BHT、 $\alpha$ -トコフェロール、 $\beta$ -チオジグリコール、およびメチオニンからなる群から選ばれる少なくとも1である前記(17)の組成物、

(19) 少なくとも酵素と界面活性剤とを含有する組成物であって、当該界面活性剤が酸化を受ける条件下で酸化物質を実質的に生じない界面活性剤であることを特徴とする、安定化された酵素を含有する組成物、

(20) 前記酵素がリパーゼである前記(19)の組成物、

(21) 前記酸化を受ける条件下で酸化物質を実質的に生じない界面活性剤が高純度のトリトンX-100またはノニオンNS-210である前記(19)または(20)の組成物、

(22) リパーゼがリポプロテインリパーゼである前記(14)、(15)、(16)、(17)、(18)、(20)、または(21)の組成物、

(23) 前記(13)から(22)のいずれかの組成物を含む試薬キット、からなる。

#### 【0009】

#### 【発明の実施の形態】

以下、本発明に係る酵素の安定化方法、好ましくはリパーゼの安定化方法および安定化された酵素を含有する組成物、好ましくは安定化されたリパーゼを含有

する組成物についてさらに詳しく説明するが、これらの説明は例示であり、説明のためのものに過ぎず、本発明を何ら限定するものではない。

#### 【0 0 1 0】

本発明は、リパーゼと界面活性剤とを含有する組成物におけるリパーゼの安定性低下が、当該界面活性剤の酸化により生成された酸化物質によることを見出したことに基づいて達成されたものである。本発明において酸化物質とは、過酸化物、例えば過酸化水素など、酸素フリーラジカル、およびスーパーオキシドアニオンなどを含む。

#### 【0 0 1 1】

一般に界面活性剤は酸化され易いことが知られているが、界面活性剤には酸化され易いものと酸化され難いものがあり、必ずしも全ての界面活性剤が酸化され易いとはいえない。また、酵素が酸化物質により失活され易いことが知られているが、酵素の種類によっても酸化物質による影響を受け易いものと受け難いものがある。さらに界面活性剤には酵素や蛋白質の安定性を保持する作用を有するものもあることから、界面活性剤を含む溶液中でリパーゼの安定性が低下する原因が界面活性剤の酸化により生成された酸化物質であることは、当業者であっても容易に想到し得るものではなく、本発明において初めて見出されたものである。

#### 【0 0 1 2】

また、界面活性剤に限らず、リパーゼを含有する組成物中に含まれる物質であって、酸化物質を生成し得る物質は、リパーゼの安定性に影響を及ぼすものと考えられる。したがって、本発明の適用は、少なくともリパーゼと界面活性剤とを含有する組成物に限定されず、少なくともリパーゼと酸化物質を生成し得る物質とを含有する組成物に適用可能である。また、リパーゼに限らず、酸化物質の影響を受ける酵素にも本発明を適用可能である。

#### 【0 0 1 3】

すなわち、本発明に係る安定化方法は、酵素と酸化物質を生成し得る物質とを含有する組成物における酵素の安定化方法であって、当該物質の酸化により生成された酸化物質の作用および／またはその生成を抑制することを特徴とする。より好ましくは、少なくともリパーゼと酸化物質を生成し得る物質とを含有する組

成物または少なくとも酵素と界面活性剤とを含有する組成物において、当該界面活性剤の酸化により生成された酸化物質の作用および／またはその生成を抑制することを特徴とする。さらに好ましくは、少なくともリパーゼと界面活性剤とを含有する組成物において、当該界面活性剤の酸化により生成された酸化物質の作用および／またはその生成を抑制することを特徴とする。また、本発明に係る安定化された酵素を含有する組成物は、少なくとも酵素と酸化物質を生成し得る物質とを含有する組成物であって、当該酸化物質の作用および／またはその生成を抑制する手段が導入された組成物である。より好ましくは、少なくともリパーゼと酸化物質を生成し得る物質とを含有する組成物または少なくとも酵素と界面活性剤とを含有する組成物であって、当該界面活性剤の酸化により生成された酸化物質の作用および／またはその生成を抑制する手段が導入された組成物である。さらに好ましくは、少なくともリパーゼと界面活性剤とを含有する組成物であって、当該界面活性剤の酸化により生成された酸化物質の作用および／またはその生成を抑制する手段が導入された組成物である。上記安定化方法および安定化された酵素を含有する組成物、より好ましくはリパーゼを含有する組成物にあっては、酸化物質を生成し得る物質、より好ましくは界面活性剤の酸化により生成された酸化物質の作用および／またはその生成が抑制されるため、酵素、より好ましくはリパーゼの安定性が有意に増加する。

#### 【 0 0 1 4 】

酸化物質の作用および／またはその生成の抑制は、例えば当該酸化物質の作用および／またはその生成を抑制する活性を有する化合物を用いて実施できる。このような化合物としては、抗酸化作用を有する化合物（以下、抗酸化剤と記載する）を例示できる。例えば、ブチルヒドロキシトルエン（*b u t y l a t e d h y d r o x y t o l u e n e*）（BHT）、 $\alpha$ -トコフェロール、 $\beta$ -チオジグリコール、メチオニン、ビタミンC（アスコルビン酸）、ユビキノール、尿酸、ビリルビン、グルタチオン、ピロロキノリンキノン（PQQ）、カロチノイド（ $\beta$ -カロチン、リコピンなど）、プロブコール、ポリフェノール〔フラボノイド類（カテキン、ルチン、ケルセチンなど）など〕、ブチルヒドロキシアニソール〔BHA；ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）の類似物〕、チオタウリン

、没食子酸、トランスフェリン、フィチン酸、またはヒト血清アルブミン（HSA）などの抗酸化剤を例示できるがこれらに限定されず、生成される酸化物質の作用および／またはその生成を抑制できる化合物であればよい。さらに、これら化合物は、酵素、好ましくはリパーゼの失活や活性阻害などの作用をもたないものが好ましい。好ましくは、ブチルヒドロキシトルエン（butylated hydroxytoluene）（BHT）、 $\alpha$ -トコフェロール、 $\beta$ -チオジグリコール、またはメチオニンが用いられる。当該化合物は、例えば酸化物質が生成された界面活性剤とリパーゼとを含む組成物に被検化合物を添加して数日間保存後にリパーゼ活性が保持されているものを選択することにより得ることができる（実施例4参照）。

#### 【0015】

酸化物質の作用および／またはその生成を抑制するためには、上記化合物、例えば上記抗酸化剤、の1種または2種以上を組み合わせ使用することができる。その使用量は、用いる化合物の種類や酸化物質の作用および／またはその生成を抑制する活性、並びに、酸化物質を生成し得る物質、例えば界面活性剤、の種類や濃度、によって適宜変更を加えることが可能であり、簡単な実験的繰返しにより決定できる。例えば、トリトンX-100（Rohm&Hass社）が終濃度0.5重量／容量％〔％（W／V）〕になるように調製されたりパーゼ含有組成物においては、BHT、 $\alpha$ -トコフェロール、 $\beta$ -チオジグリコール、またはメチオニンが、それぞれ終濃度1mM～10mM、0.01重量／容量％～0.1重量／容量％、1mM～100mM、または1mM～100mMになるように添加されていることが好適である。

#### 【0016】

酸化物質の作用および／またはその生成の抑制は、抗酸化剤などの化合物の使用以外に、酸化酵素を用いてその酵素反応を利用することによっても可能である。酸化酵素としては、グルタチオンペルオキシダーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ、NADHペルオキシダーゼ、ホスホリパーゼ・A2-グルタチオンペルオキシダーゼ共役系、アルキルヒドロペルオキシドレダクターゼ、NADHオキシダーゼなどが例示できる。



## 【0017】

本発明が適用される界面活性剤は、非イオン性界面活性剤として、オクチルグルコシド、ペプチルチオグルコシド、デカノイル-N-メチルグルカミド、ポリオキシエチレンドデシルエーテル、ポリオキシエチレンヘプタメチルヘキシルエーテル、ポリオキシエチレンイソオクチルフェニルエーテル（トリトンXシリーズ）、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、スクロース脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビトールエステル（Tweenシリーズ）などが、陰イオン性界面活性剤として、ドデシル硫酸ナトリウム、ドデシルスルホン酸ナトリウム、ドデシル-N-サルコシン酸ナトリウム、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、タウロデオキシコール酸ナトリウムなどが、陽イオン性界面活性剤として、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、テトラデシルアンモニウムブロミド、ドデシルピリジニウムクロリドなどが、両イオン性界面活性剤として、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホン酸（CHAPS）、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホン酸（CHAPSO）、パルミトイルリゾレシチン、ドデシル-N-ベタイン、ドデシル- $\beta$ -アラニンなどが例示できるがこれらに限定されない。

## 【0018】

界面活性剤の中には、酸化を受ける条件下においても酸化物質が実質的に生成されないものがある。このような酸化され難い界面活性剤を選択して用いることも、本発明に係る安定化方法の範囲に含まれる。ここで、界面活性剤が酸化を受ける条件とは、当該界面活性剤の酸化反応が開始し進行する条件をいい、例えば透光性の非密閉容器中で光または熱の影響を長期間、例えば数日間以上受けるといった条件、または透光性の密閉容器中で酸素置換後に露光条件下で攪拌するといった条件が挙げられる。酸化物質が実質的に生成されないとは、例えば、生成された過酸化水素様物質が、リパーゼ活性に影響しない程度に少ないことを意味する。具体的には例えば上記条件下で酸化されたときに生成された過酸化水素様物質が約5  $\mu$ M以下であることを示す。かかる酸化され難い界面活性剤としては、ノニオンNS-210や高純度のトリトンX-100（Sigma社製、T-



9 2 8 4) が例示できるが、これらに限定されない。酸化され難い界面活性剤の選別は、例えば界面活性剤の水溶液を遮光せずに例えば室温で保存し、生成される酸化物質を定量することにより実施可能である（実施例 2 参照）。また、透光性の密閉容器中で酸素置換後に露光条件下で攪拌することにより強制的に酸化させて、生成される酸化物質を定量することによっても選別可能である（実施例 3 参照）。本発明において単にトリトン X-100 というときは、高純度のトリトン X-100（Sigma 社製、T-9284）ではなく、酸化を受ける条件下で過酸化水素様物質を生成し得るものをいう。

#### 【0019】

本発明において用いられる界面活性剤の濃度は、液状時における終濃度が 1 重量／容量％～0.001 重量／容量％となるように添加されていることが好適で、より好ましくは 0.1 重量／容量％～0.005 重量／容量％で用いる。また、これら界面活性剤は単独で使用してもよく、または 2 種以上を組み合わせ使用してもよい。好ましくは、酵素、例えばリパーゼの失活や活性阻害などの作用をもたない界面活性剤を選択して用いる。

#### 【0020】

本発明が適用されるリパーゼは、リポプロテインリパーゼ（LPL）、ホスホリパーゼ、腓リパーゼ、肝性トリアシルグリセロールリパーゼ（HTGL）、糖脂質分解リパーゼ、スフィンゴ脂質分解リパーゼ、およびホルモン感受性リパーゼなどのいずれであってもよいが、好ましくは LPL である。また、リパーゼは、動物由来、ヒト血漿由来、または遺伝子工学的手法で調製されたもののいずれであってもよく、その由来、調製方法、および存在状態により限定されない。リパーゼの濃度は、その酵素活性が目的とする活性値に調整されていればよく、特に限定されない。

#### 【0021】

具体的には例えば、本発明に係る安定化されたりパーゼを含有する組成物は、液状製剤にあつては液状製剤中に少なくともリパーゼおよび界面活性剤を上記の濃度で含有させ、さらに界面活性剤の酸化により生成された酸化物質の作用および／またはその生成を抑制する活性を有する化合物をその有効量含有させてなる

。乾燥製剤または凍結乾燥製剤にあつては最終的に液状になしたときの終濃度がかかる濃度になるように調整し含有させてなる。溶液状態において、リパーゼ含有組成物は、通常、緩衝液が使用される。その種類は、pH 4～9の範囲に緩衝能をもつ緩衝剤を適宜選択して用いる。例えば、MES、HEPES、MOPS、BIS-TRIS、TRIS、MOPSO、またはADAなどから1種若しくは2種以上が選択され用いられる。また、適当な防腐剤を添加してもよい。防腐剤としては、アジ化ナトリウム、シプロフロキサシン、プロピオン酸若しくは安息香酸ナトリウムなどの中から1種若しくは2種以上が選択して用いられる。また、必要に応じて食塩などの塩や、アミノ酸、糖などの一般的な安定化剤などを含ませることもある。

#### 【0022】

かくして得られたリパーゼ含有組成物は、従来使用されているリパーゼ含有試薬やリパーゼ含有組成物と比較して安定性が高く有用である。より具体的には、例えば、10 mM～1000 mMの緩衝液に、0.01重量/容量%～10重量/容量%の界面活性剤、例えばトリトンX-100を加え、抗酸化剤、例えばBHTを1 mM～10 mM添加する。防腐剤を添加した後、溶液のpHを6～7付近に調整して母液を調製する。この母液に目的とする濃度または活性量のリパーゼを溶解し、リパーゼ含有溶液を調製する。その溶液を適当な孔径のフィルターでろ過することもある。このようにして調製されたリパーゼ溶液は、そのまま液状試薬としてあるいは凍結乾燥処理して乾燥製剤試薬として製剤化され使用に提供される。上記具体例は、本発明に係る組成物の一例を示すものであり、本発明はこの例に限定されるものではない。

#### 【0023】

本発明に係る安定化されたリパーゼ含有組成物は、検体中の脂質成分、例えば中性脂質、リン脂質、糖脂質、およびスフィンゴ脂質など、並びにリポプロテインを定量する試薬として広く用いることが可能である。また、検体中のリパーゼを定量するときの標準物質として使用できる。かくして本発明においては、上記組成物を充填した1個またはそれ以上の容器を含んでなる試薬キットを提供可能である。本組成物または本試薬キットは、製品での安定性や保存期間中の安定性

が優れているため、測定試薬として最も重要な測定値の正確性や精密性が確保されている。

#### 【0024】

##### 【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

#### 【0025】

##### 【実施例1】

非イオン系界面活性剤トリトンX-100を添加したときのリポプロテインリパーゼの安定性を、遮光状態完全密閉容器に保存したトリトンX-100とポリエチレン容器中に保存して卓上放置したトリトンX-100について比較した。

#### 【0026】

グッド緩衝液 (Good's Buffer) MES 50 mM、シュウ酸 100 mM、グルコース 80 mM、 $\beta$ -NADP 6.0 mM、アジ化ナトリウム 0.1%、ADP依存性ヘキソキナーゼ 10.0 U/mL、およびリポプロテインリパーゼ 1500 U/mLからなる水溶液 (pH 6.5) にトリトンX-100 (Rohm & Haas社) を0.0% (W/V) または0.5% (W/V) 添加した試薬 (以下、サンプルと呼ぶ) を調製し、37℃の条件下で6日間保存した後にリパーゼ活性を測定した。

#### 【0027】

まず、上記サンプルに下記組成の第一試薬 300  $\mu$ l を添加し、37℃で5分間反応させた。次いで、下記組成の第二試薬 50  $\mu$ l を添加し、その2分後より、主波長 340 nm / 副波長 600 nm における吸光度変化量を測定することによりリパーゼ活性を測定した。

#### 【0028】

## 第一試薬 (pH 7.5)

---

|                              |          |
|------------------------------|----------|
| B i c i n e                  | 50.0 mM  |
| H E P E S                    | 23.3 mM  |
| 塩化カリウム                       | 100.0 mM |
| 塩化マグネシウム・6H <sub>2</sub> O   | 8.1 mM   |
| グルコース                        | 27.0 mM  |
| トリトン X-100                   | 0.208 %  |
| A T P ・ 2 N a                | 2.7 mM   |
| $\beta$ -N A D P (酸化型)       | 1.9 mM   |
| グリセロールキナーゼ                   | 2.3 U/mL |
| グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G 6 P D H) | 4.3 U/mL |
| A D P 依存性ヘキソキナーゼ             | 2.7 U/mL |

---

## 【0029】

## 第二試薬

---

ハイレベルチェック・リピッド      9.0 mL の精製水にて溶解

---

## 【0030】

結果は、上記溶液を 2～8℃で保存したときのリパーゼ活性を 100%としたときの残存活性として表し、表 1 に示した。完全密閉容器中で保存したトリトン X-100 を添加したときは、無添加のときよりリポプロテインリパーゼの安定性が増した。このことから、界面活性剤そのものにはリポプロテインリパーゼの安定化効果があることが明らかである。しかし、ポリエチレン容器中で卓上放置したトリトン X-100 を用いたときは、放置期間が長いもの程リポプロテインリパーゼの安定性が低下することが判明した。

## 【0031】

【表 1】

(リポプロテインリパーゼの安定性への界面活性剤の効果：37℃保存)

| 界面活性剤    | リパーゼ残存活性 (%) |
|----------|--------------|
| A        | 28.4         |
| B        | 32.4         |
| C        | 45.5         |
| D        | 55.6         |
| 完全密閉容器保存 | 82.5         |
| 無添加      | 67.0         |

表中 A～D は、界面活性剤をポリエチレン容器中で卓上放置した期間の長さを表し、A が最もその期間が長い。

## 【0032】

## 【実施例 2】

種々の界面活性剤を添加したときのリポプロテインリパーゼの安定性を測定した。種々の界面活性剤を用いて、サンプルを実施例 1 と同様の方法で調製し、30℃の条件下で 6 日間保存した後に、リポプロテインリパーゼの残存活性を実施例 1 と同様に求め、リポプロテインリパーゼの安定性を比較した。

## 【0033】

また、用いた各界面活性剤の 5 % (W/V) 水溶液中の過酸化水素様物質を定量した。過酸化水素様物質の定量は細菌由来ペルオキシダーゼを用いた酵素比色法により実施した。まず、サンプル 20  $\mu$  l に、下記組成の第一試薬 200  $\mu$  l を添加して 37℃で 5 分間反応させた。次いで、波長 600 nm における吸光度を測定した。その後、下記組成の第二試薬 50  $\mu$  l を添加してさらに 37℃で 5 分間反応させ、波長 600 nm における吸光度を測定した。第二試薬の添加前と添加後の吸光度差から過酸化水素様物質を定量した。

## 【0034】

## 第一試薬 (p H 7. 0)

---

|                  |           |
|------------------|-----------|
| B E S            | 9 3 9 m g |
| B i s - T r i s  | 3 2 0 m g |
| H D A O S        | 2 4 m g   |
| 牛血清アルブミン (B S A) | 2 0 0 m g |

---

合計 1 0 0 m L

ここで、H D A O S は N - ( 2 - ヒドロキシ - 3 - スルホプロピル ) - 3 , 5 - ジメトキシアニリン・ナトリウム塩である。

## 【 0 0 3 5 】

## 第二試薬 (p H 7. 0)

---

|                 |               |
|-----------------|---------------|
| B E S           | 3 7 5 . 6 m g |
| B i s - T r i s | 1 2 8 . 0 m g |
| 4 - アミノアンチピリン   | 1 3 0 . 4 m g |
| B S A           | 8 0 . 0 m g   |
| ペルオキシダーゼ        | 1 5 0 0 U     |

---

合計 4 0 m L

## 【 0 0 3 6 】

このとき、3 0 % の過酸化水素 ( H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) を精製水で適宜希釈して標準液として用いた。

## 【 0 0 3 7 】

結果は表 2 に示した。同じ界面活性剤でも相対的に過酸化水素様物質が多く含まれているものを添加したときの方が、リポプロテインリパーゼの安定性が低下した。同じ界面活性剤でも、保存状況や保存期間が違うために過酸化水素様物質の含量が異なっていた。リポプロテインリパーゼの残存活性と用いた界面活性剤中に含まれる過酸化水素様物質の量との間には、逆相関が認められた。



## 【 0 0 3 8 】

## 【表 2】

(リポプロテインリパーゼの安定性低下と界面活性剤水溶液中の過酸化水素様物質との関連)

| 界面活性剤       | リパーゼ残存活性 (%) | 過酸化水素様物質 ( $\mu$ M) |
|-------------|--------------|---------------------|
| トリトン X-100  | 51.6         | 18.08               |
| トリトン X-100  | 82.5         | 2.78                |
| ニッコール OP-10 | 85.5         | 0.43                |
| ニッコール BT-9  | 68.9         | 4.58                |
| ニッコール BT-9  | 98.4         | 0.32                |
| ノニオン NS-210 | 96.9         | 0.03                |
| ノニオン HS-210 | 73.6         | 7.91                |
| ノニオン HS-210 | 91.3         | 0.09                |
| エマルゲン 810   | 91.5         | 0.13                |
| エマルゲン 909   | 90.8         | 3.10                |
| 過酸化水素水      | 26.9         | 34.45               |

## 【 0 0 3 9 】

実施例 1 の結果と実施例 2 の結果より、界面活性剤水溶液中の過酸化水素様物質がリポプロテインリパーゼの失活に関連していることが示唆された。すなわち、界面活性剤の酸化により生成された酸化物質がリポプロテインリパーゼを失活させるものと考えられる。

## 【 0 0 4 0 】

## 【実施例 3】

界面活性剤を含む溶液中でのリポプロテインリパーゼの失活が界面活性剤の酸化により生成された酸化物質によるものであることを確認するために、強制的に酸化せしめた界面活性剤のリパーゼ安定性に対する影響を検討した。

## 【 0 0 4 1 】

界面活性剤を強制的に酸化するために、トリトン X-100 (R o h m & H a s s 社)、高純度のトリトン X-100 (S i g m a 社製、T-9284)、またはノニオン NS-210 の 10% (W/V) 水溶液をそれぞれ調製し、ガラス製の三角フラスコに移した後、酸素ガスにて置換し、密栓後、露光条件下でスタ

ーラーによる攪拌を行った。強制酸化を行わない界面活性剤水溶液は、調製して三角フラスコに移した後、アルゴンガス置換し、密栓後、遮光下で保存した。強制酸化した界面活性剤または強制酸化しないものを用いて実施例 1 と同様にサンプルを調製し、37℃の条件下で6日間保存後に、リポプロテインリパーゼ残存活性を実施例 1 と同様に求め、リポプロテインリパーゼの安定性を比較した。また、各界面活性剤の10% (W/V) 水溶液中の過酸化水素様物質を実施例 2 と同じ方法で定量した。

#### 【0042】

表3に示したように、界面活性剤の酸化により過酸化水素様物質が生成されること、また酸化されて過酸化水素様物質が増加した界面活性剤を用いるとリポプロテインリパーゼの安定性が著しく低下することが判明した。また、ノニオン NS-210 および高純度のトリトン X-100 は、強制酸化しても過酸化水素様物質の生成量が少ないため、リポプロテインリパーゼの安定性に影響しないことが明らかになった。

この結果から、界面活性剤の酸化により生成される酸化物質がリポプロテインリパーゼの安定性を低下せしめること、また酸化を受ける条件下でも酸化物質を生成しない界面活性剤を用いることによりリポプロテインリパーゼの安定性を保持できることが分かった。

#### 【0043】

【表3】

(界面活性剤の酸化によるリポプロテインリパーゼの安定性の低下)

| 界面活性剤               | 強制酸化 | リパーゼ残存活性<br>(%) | 過酸化水素様物質<br>( $\mu$ M) |
|---------------------|------|-----------------|------------------------|
| トリトン X-100          | 有り   | 65.4            | 15.63                  |
|                     | 無し   | 80.5            | 8.16                   |
| トリトン X-100<br>(高純度) | 有り   | 82.0            | 0.50                   |
|                     | 無し   | 85.6            | 0.28                   |
| ノニオン NS-210         | 有り   | 89.6            | 0.10                   |
|                     | 無し   | 89.9            | 0.08                   |

#### 【0044】

## 【実施例 4】

界面活性剤を含有する溶液中でのリポプロテインリパーゼの安定性低下に対する各種化合物の効果を検討した。界面活性剤としてトリトン X-100 (Rohm & Haas 社) を 0.5% (W/V) で用い、実施例 1 と同様に調製したサンプルに各種化合物を添加して 37℃ の条件下で 6 日間保存後に、リポプロテインリパーゼ残存活性を実施例 1 と同様の方法で求め、リポプロテインリパーゼの安定性を比較した。

## 【0045】

抗酸化剤ブチルヒドロキシトルエン (BHT)、 $\alpha$ -トコフェロール、 $\beta$ -チオジグリコール、またはメチオニンを添加することにより、界面活性剤を含有する溶液中でのリポプロテインリパーゼの安定化効果が認められた。

## 【0046】

## 【表 4】

(抗酸化剤添加によるリポプロテインリパーゼの安定性の向上：37℃ 保存)

| 化合物名              | 濃度    | リパーゼ残存活性(%) |
|-------------------|-------|-------------|
| BHT               | 5mM   | 84.1        |
| $\alpha$ -トコフェロール | 0.05% | 80.2        |
| $\beta$ -チオジグリコール | 0.5%  | 93.7        |
| L-メチオニン           | 10mM  | 94.4        |
| EDTA·2Na          | 5mM   | 41.6        |
| BSA               | 0.5%  | 61.4        |
| スクロース             | 1.0%  | 42.3        |
| トレハロース            | 1.0%  | 42.8        |
| HB- $\beta$ -CD   | 1.0%  | 43.9        |
| 無添加               | —     | 44.3        |

## 【0047】

## 【発明の効果】

以上説示したように、界面活性剤とリパーゼを含有する組成物においては、界面活性剤が酸化されたときに生成される酸化物質がリパーゼの安定性を低下させる。界面活性剤には酸化され易いものと酸化され難いものがあるため、界面活性剤を含む組成物中のリパーゼの安定性を向上させるためには、酸化され難い界面

活性剤を選択して用いた方がよいこと、また酸化され易い界面活性剤を用いるときには当該界面活性剤の酸化により生成された酸化物質の作用および／またはその生成を抑制する手段、例えば抗酸化剤などの化合物の併用、を導入することが重要であることを見出した。さらに、本発明は、界面活性剤とリパーゼを含有する組成物に限らず、酸化物質を生成し得る物質と酵素とを含有する組成物に適用可能である。かくして、本発明に係る酵素の安定化方法、好ましくはリパーゼの安定化方法および該安定化方法により安定化された酵素を含有する組成物、好ましくは安定化されたりパーゼを含有する組成物は、長期間保存可能かつ正確性を有する臨床検査用試薬組成物の提供を可能とするため、極めて有用である。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 リパーゼの安定化方法および安定化されたりパーゼ含有組成物の提供

。

【解決手段】 リパーゼと界面活性剤とを含有する組成物において当該界面活性剤の酸化により生成された酸化物質の作用および／またはその生成を抑制すること、例えば抗酸化剤（例えば、BHT、 $\alpha$ -トコフェロール、 $\beta$ -チオジグリコール、およびメチオニンからなる群から選ばれる少なくとも1）をその有効量含有させること、を特徴とするリパーゼの安定化方法、並びにリパーゼおよび界面活性剤を含有し、さらに当該界面活性剤の酸化により生成された酸化物質の作用および／またはその生成を抑制する手段が導入された、例えば抗酸化剤（例えば、BHT、 $\alpha$ -トコフェロール、 $\beta$ -チオジグリコール、およびメチオニンからなる群から選ばれる少なくとも1）をその有効量含有させた、安定化されたりパーゼ含有組成物。

認定・付加情報

|         |                          |
|---------|--------------------------|
| 特許出願の番号 | 特願 2 0 0 2 - 2 3 2 6 9 5 |
| 受付番号    | 5 0 2 0 1 1 9 0 1 0 9    |
| 書類名     | 特許願                      |
| 担当官     | 第五担当上席 0 0 9 4           |
| 作成日     | 平成 1 4 年 8 月 1 4 日       |

< 認定情報・付加情報 >

|       |             |
|-------|-------------|
| 【提出日】 | 平成14年 8月 9日 |
|-------|-------------|

次頁無



特願 2 0 0 2 - 2 3 2 6 9 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 3 9 0 0 1 4 9 6 0 ]

1 . 変 更 年 月 日 1 9 9 8 年 1 0 月 7 日  
[ 変 更 理 由 ]

名称変更  
住所変更  
住 所 神 戸 市 中 央 区 脇 浜 海 岸 通 1 丁 目 5 番 1 号  
氏 名 シ ス メ ッ ク ス 株 式 会 社